

Resistencia al nematodo *Meloidogyne* en patrones de tomate a temperaturas del suelo superiores a los 28°C

Soledad Verdejo-Lucas*, María Blanco^a y Laura Cortada*** (a IRTA. Patología Vegetal. Cabriels, Barcelona, Spain). * Correo electrónico: soledad.verdejo@irta.cat. ** Dirección actual: FAO Somalia, Hargeisa Office. Somalia). *** F. Javier Sorribas^b. (b DEAB-UPC, Castelldefels, Barcelona, Spain).

El gen *Mi* en tomate confiere resistencia al nematodo *Meloidogyne*, aunque su eficacia disminuye a temperaturas superiores a los 28°C. Para determinar la resistencia relativa de 12 patrones y cultivares de tomate frente a *M. arenaria* y *M. javanica* se realizaron ensayos en un invernadero sin control climático donde las plantas estaban sujetas a fluctuaciones diarias de temperatura. En el transcurso de los ensayos, la temperatura del suelo fue superior a 28°C durante 31 días en el primer ensayo (Exp.1) y durante 20 días en el segundo (Exp. 2). El intervalo de tiempo en que la temperatura se mantuvo por encima de los 28°C osciló entre 0,5 a 6 horas/día en el Exp.1 y entre 0,5 a 7,5 horas/día en Exp. 2. Los patrones Morgan, King Kong y Unifort consistentemente mostraron alta resistencia frente a *M. arenaria* y *M. javanica* en ambos experimentos, incluso con picos de temperaturas superiores a 28°C durante parte del experimento. Los patrones Multifort y Maxifort expresaron menor grado de resistencia que los anteriores bajo las mismas condiciones experimentales. En general, la tasa de multiplicación de *M. javanica* fue mayor ($P < 0,05$) que la de *M. arenaria* tanto en los tomates resistentes como en los susceptibles.

PALABRAS CLAVE: Gen *Mi*, *Meloidogyne arenaria*, *M. javanica*, Resistencia, Temperatura del suelo.

INTRODUCCIÓN

Una parte considerable de la producción mundial de tomate se realiza en climas templados y cálidos donde los nematodos formadores de nódulos (agallas) del género *Meloidogyne* son patógenos importantes. Como organismos poikilotérmicos dependen de la temperatura para completar su ciclo de vida, la cual, condiciona su desarrollo y reproducción. La temperatura basal para el desarrollo del nematodo es 10°C y necesita acumular entre 600 a 700 grados día para completar una generación.

La resistencia a nematodos se define como la habilidad de una planta con uno o más genes de resistencia de reducir su desarrollo y/o reproducción en comparación con una planta susceptible de la misma especie. En tomate, el gen *Mi* confiere resistencia, aunque no inmunidad, a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* y reduce la reproducción del nematodo un 85% como mínimo respecto a un tomate susceptible (ROBERTS and THOMASON, 1986; SORRIBAS *et al.*, 2005). Sin embargo, la eficacia del gen *Mi* disminuye a altas temperaturas del suelo (HOLTZMANN, 1965; DROPKIN, 1969).

El injerto del tomate es una técnica que permite producir variedades de tomate en áreas con limitaciones edafo-climáticas o en suelos infestados con patógenos. Los patrones estimulan el vigor de la variedad injertada (Figura 1), mejoran el rendimiento del cultivo y aumentan su tolerancia a factores abióticos tales como la salinidad y las bajas temperaturas. Asimismo, los patrones pueden contrarrestar los daños ocasionados por los patógenos porque son portadores de genes de resistencia frente a virus, hongos, bacterias y/o nematodos (DE MIGUEL, 2002; LOUWS *et al.*, 2010). El objetivo de este estudio fue determinar la resistencia relativa de patrones y cultivares de tomate frente a *M. arenaria* y *M. javanica* en un invernadero sin control climático para simular las condiciones de los cultivos protegidos en los que las plantas están sujetas a fluctuaciones diarias de temperatura.



Figura 1. Vista parcial de un ensayo con patrones de tomate que se caracterizan por estimular el vigor de la variedad injertada.

Materiales y métodos

Los patrones y cultivares de tomate portadores del gen *Mi* se inocularon con 6.000 huevos por planta de dos aislados del nematodo, *M. arenaria* MA-68 y *M. javanica* MJ-05. Las características de resistencia de los tomates de acuerdo con la información proporcionada por las compañías de semillas se presentan en la Tabla 1. El tomate resistente Firam y los susceptibles Ikram y Motril se utilizaron como controles de referencia. Las semillas fueron proporcionadas por las respectivas compañías de semillas y se prepararon ocho repeticiones por cada patrón y aislado del nematodo. Las plantas se colocaron al azar en una banqueta en el invernadero, el cual se ventilaba mediante ventanas laterales y cenitales que se abrían durante el día y mantenían cerradas durante la noche. Se registró la temperatura del suelo mediante sondas insertadas a 7 cm de profundidad en las macetas. La temperatura media diaria se calculó como el promedio de la temperatura máxima y mínima.

Se realizaron dos ensayos siguiendo el mismo procedimiento y condiciones experimentales. El primer ensayo (Exp. 1) finalizó cuando el nematodo había acumulado 754 grados día (temperatura basal 10°C), a los 65 días post-inoculación (dpi), mientras que el segundo ensayo (Exp.2) finalizó cuando el nematodo había acumulado 719 grados día, a los 88 dpi. En este segundo ensayo se incluyeron

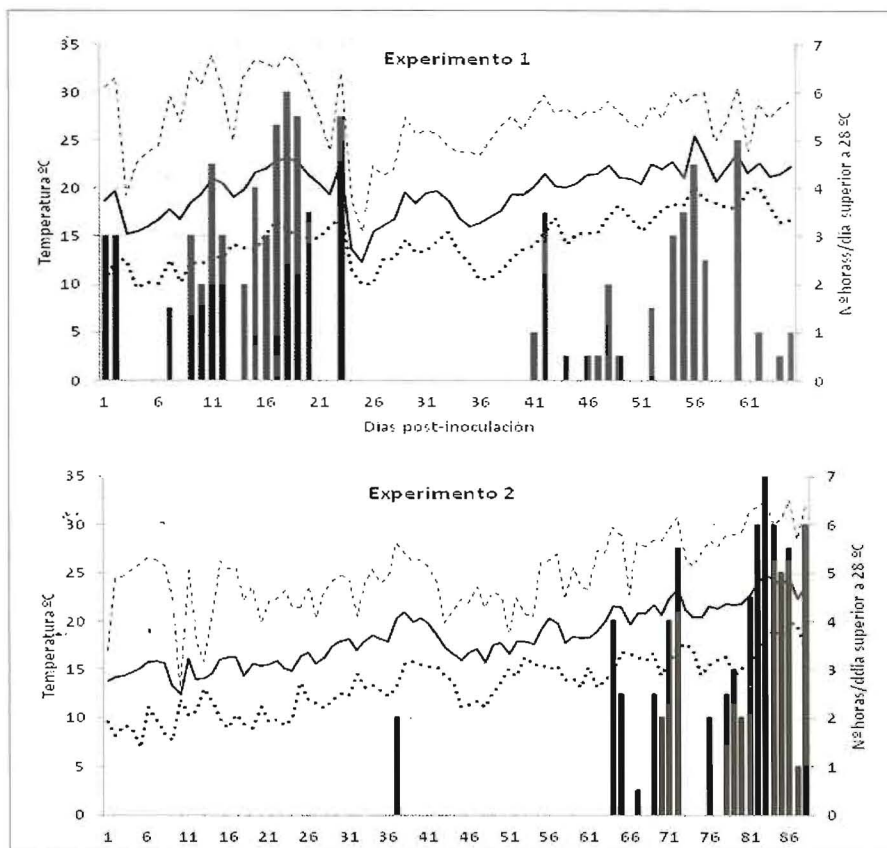


Figura 2. Registro de las temperaturas del suelo durante los ensayos realizados para determinar la resistencia a *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica* en patrones y cultivares de tomate en un invernadero sin control climático. Temperaturas máximas (línea discontinua), mínima (línea de puntos) y promedio diario (línea continua) a 7 cm de profundidad en las macetas plantadas con los tomates desde el 9 de abril a 16 de junio 2010 (Experimento 1) y desde el 2 de marzo a 30 de mayo 2011 (Experimento 2). Las barras en negro indican el número de horas/día con temperaturas del suelo superiores a 28 °C.

Tomate	Compañía de semillas	Resistencia ^a
Patrón		
Brigeor	Gautier	HR: Ma/Mi/Mj
Morgan	Ramiro Arnedo	No disponible
King Kong RZ	Rijk Zwaan	IR: Ma/Mi/Mj
Unifort	De Ruiter Seeds	HR: Ma/Mi/Mj
Emperador	Rijk Zwaan	IR: Ma/Mi/Mj
Maxifort	De Ruiter Seeds	HR: Ma/Mi/Mj
Multifort	De Ruiter Seeds	HR: Ma/Mi/Mj
Cultivar		
Firam	Semillas Fitó	HR: M
Caramba	De Ruiter Seeds	HR: Ma/Mi/Mj
Durinta	Western Seeds	Susceptible
Motril	Semillas Fitó	Susceptible
Ikram	Syngenta Seeds	Susceptible

^a HR: Allamente resistente; IR: resistencia intermedia. M: *Meloidogyne*; Ma: *Meloidogyne arenaria*; Mi: *Meloidogyne incognita*; Mj: *Meloidogyne javanica*.

Tabla 1. Resistencia a *Meloidogyne* de los patrones y cultivares comerciales de tomate utilizados para determinar la resistencia a *M. arenaria* (MA-68) y *M. javanica* (MJ-05) en macetas en un invernadero sin control climático.

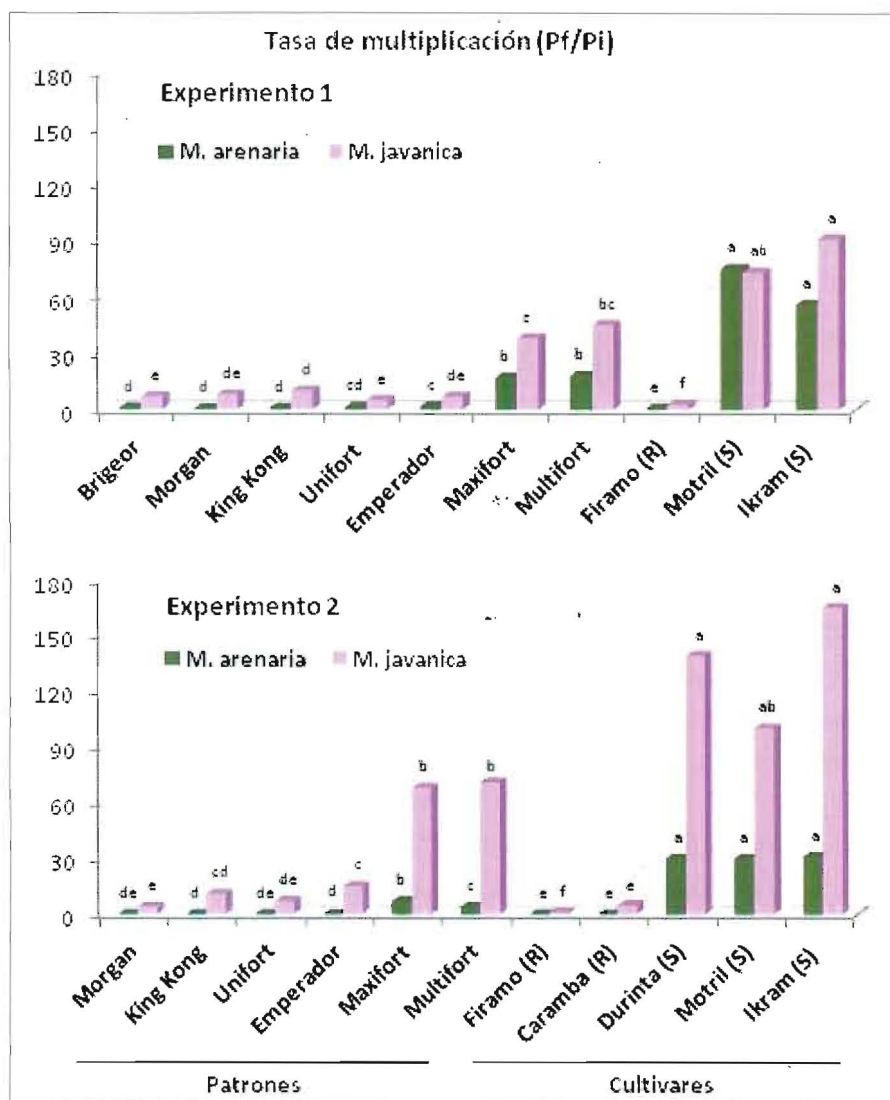


Figura 3. Tasa de multiplicación (huevo/planta (Pf) dividido por huevos inoculados (Pi)) de *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica* en patrones y cultivares de tomate en un invernadero sin control climático que simulaba las condiciones de los cultivos protegidos con fluctuaciones diarias de temperatura. Cada valor es media de ocho repeticiones. Para cada experimento y aislado del nematodo, las barras que comparten la misma letra no difieren de acuerdo con el Test LSD ($P < 0,05$).

los tomates Caramba (resistente) y Durinta (susceptible) que utilizamos regularmente en nuestro laboratorio pero no se incluyó el patrón Brigeor.

Al finalizar los ensayos, se determinó el número de huevos por gramo de raíz mediante la maceración de las raíces en una solución de hipoclorito sódico (NaOCl) al 0,5% durante 10 minutos. La tasa de multiplicación del nematodo (Pf/Pi) se calculó como el número de huevos/planta al finalizar el ensayo (Pf) dividido por el número de huevos inoculados (Pi). El índice de reproducción (RI) se calculó como el número de huevos/ gramo de raíz en el patrón resistente dividido por el número de huevos/ gramo de raíz en el tomate susceptible $\times 100$ (Triantaphyllou, 1975) y éste fue el criterio

utilizado para establecer el grado de resistencia de los patrones respecto a los tomates susceptibles. Los patrones se clasificaron en altamente resistente (HR) cuando el valor del RI $< 11\%$; resistencia intermedia (IR), cuando el RI oscilaba entre 12% y 50% y susceptible si el valor de RI $> 50\%$ de acuerdo con la nomenclatura de la Federación Internacional de Semillas (www.worldseed.org).

Para los análisis estadísticos, se utilizó el paquete estadístico SAS V9.2 software. Inicialmente, se realizó un análisis de la varianza que mostró que había diferencias significativas entre ensayos y aislados del nematodo, por lo que posteriormente se analizó por separado la resistencia de los patrones a cada uno de los aislados del nematodo. Cuando

el análisis mostraba diferencias significativas ($P \leq 0,05$), las medias se separaron mediante el Test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD).

Resultados

Los ensayos finalizaron cuando el nematodo había acumulado un número similar de unidades térmicas, 754 y 719 grados día en Exp.1 y Exp. 2, respectivamente, pero la temperatura se acumuló más rápidamente en el Exp. 1 (65 dpi) que en el Exp. 2 (88 dpi) (Figura 2). Durante ambos ensayos se registraron temperaturas del suelo superiores a los 28°C y los picos de alta temperatura se produjeron de forma intermitente. Según se desprende de los registros de temperatura (Figura 2), el Exp. 1 simulaba el trasplante del tomate cuando las temperaturas del suelo son altas (ej. verano), mientras que en el Exp. 2, simulaba el trasplante cuando las temperaturas del suelo son moderadas (ej. primavera) y van aumentando progresivamente a lo largo del ciclo de cultivo. Así, los picos de temperatura (suelo) superiores a 28°C se observaron principalmente al principio del Exp. 1, y hacia el final en el Exp. 2 (Figura 2). Se observaron picos de temperatura superiores a los 28 °C durante 31 días en el Exp. 1 y durante 20 días en el Exp. 2. La duración de los picos osciló entre 0,5 a 6 horas/día y entre 0,5 a 7, 5 horas/día en el Exp. 1 y Exp. 2, respectivamente.

La respuesta de alta resistencia mostrada por el cultivar resistente Firamo, utilizado como control, confirmó la avirulencia para el gen *Mi* de los aislados de *M. arenaria* y *M. javanica* seleccionados para el estudio. En el Exp. 1, la población inicial de *M. arenaria* no incrementó ($Pf/Pi \leq 1$) en los patrones Brigeor, Morgan o King Kong y los valores de la Pf/Pi oscilaron entre 0,5 veces en Morgan a 18 veces en Multifort (Figura 3). La tasa de multiplicación de *M. arenaria* fue ligeramente superior a la unidad en los patrones Unifort (1,2 veces) y Emperador (1,7 veces). Sin embargo, la población inicial de *M. javanica* incrementó ($Pf/Pi > 1$) en todos los patrones resistentes y los valores oscilaron entre 5 veces en Unifort a 45 veces en Multifort (Figura 3). En este primer ensayo, los patrones Brigeor, Morgan, King Kong, Unifort y Emperador mostraron un alto grado de resistencia (HR) a *M. arenaria* y *M. javanica*, puesto que los valores de RI fueron inferiores a 11% (Figura 4) pero los patrones Multifort y Maxifort sólo mostraron resistencia intermedia (IR) con valores de RI entre el 12% y 40% respecto al control susceptible Ikram (Figura 4).

En el segundo ensayo (Exp. 2), la tasa de multiplicación de *M. arenaria* osciló entre 0,4 veces en Morgan a 7 veces en Maxifort (Figura 3). Las poblaciones iniciales de *M. javanica* incrementaron en todos los patrones y los valores de la Pt/Pi oscilaron entre 4 veces en Morgan a 71 veces en Multifort (Figura 3). En este ensayo, Multifort mostró alta resistencia (HR) a *M. arenaria*, Emperador resistencia intermedia a *M. javanica*, mientras que la respuesta de Multifort y Maxifort fue de resistencia intermedia o de susceptibilidad dependiendo del cultivar susceptible de referencia con el que se les comparaba (Figura 4).

La tasa de multiplicación de *M. javanica* fue, en general, mayor ($P<0,05$) que la de *M. arenaria* tanto en los tomates resistentes como en los susceptibles (datos no mostrados).

Discusión

Los resultados de este y otros estudios señalan que el gen *Mi* es funcional a temperaturas superiores a los 28°C (ARAUJO *et al.*, 1982b; TALAVERA *et al.*, 2009; VERDEJO-LUCAS *et al.*, 2009), aunque la estabilidad del gen *Mi* a altas temperaturas parece ser que depende de la temperatura alcanzada (intensidad), de cuando se produce el incremento de la temperatura (tiempo post-infección de la planta) y de la duración del periodo de calor, aunque las evidencias del efecto de estos factores sobre la estabilidad del gen *Mi* son indirectas. En este estudio se muestra que la resistencia del gen *Mi* se manifestaba incluso aún cuando las temperaturas máximas alcanzaban hasta 34°C y había picos de temperatura superiores a 28°C durante 7,5 horas/día. Sin embargo, Cortada *et al.* (2008) mostraron que la resistencia del gen *Mi* se perdía cuando la duración de los picos de temperatura superiores a 28°C era de 10 a 12 horas/día durante los primeros siete días post-inoculación del nematodo. Aparentemente, las primeras 48-72 horas son críticas para que se produzca la rotura de la resistencia. Según la bibliografía, se necesitan temperaturas constantes de 32°C durante 48-72 horas para que se rompa la resistencia (DROPKIN, 1969; ARAUJO *et al.*, 1982a). No obstante, temperaturas superiores a 28°C reducen la eficacia del gen *Mi* (HOLTSMANN, 1965; DROPKIN, 1969) aunque no llegue a producirse la rotura completa de la resistencia. Similarmente, los patrones Beaufort y Vigomax mostraban alta resistencia a *M. incognita* raza 2 a temperatura constante de 24°C, pero a temperatura constante de 32°C sólo mostraban resistencia intermedia (DEVIRAN *et al.*, 2010).

La resistencia mostrada por los patrones

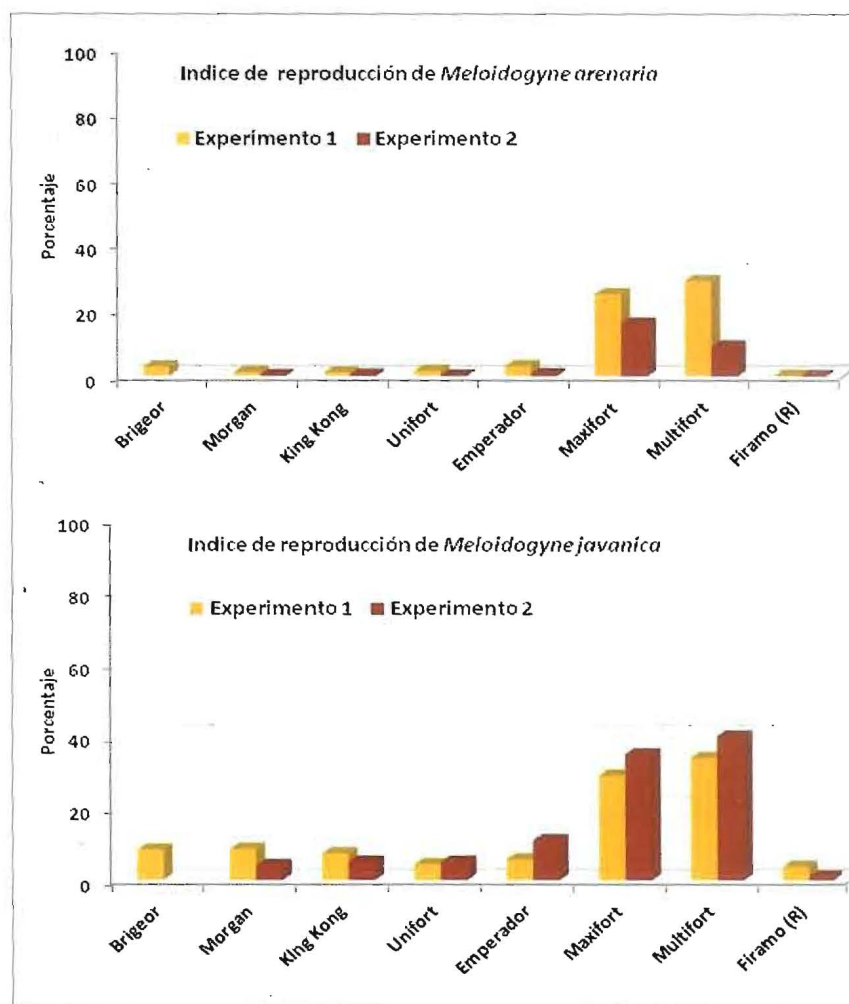


Figura 4. Índice de reproducción (huevos/gramo de raíz en el patrón dividido por huevos/gramo de raíz en el tomate susceptible Ikram x 100) de *Meloidogyne arenaria* y *Meloidogyne javanica* en patrones de tomate portadores del gen *Mi* de resistencia en un invernadero sin control climático que simula las condiciones de los cultivos protegidos con fluctuaciones diarias de temperatura.

Morgan, King Kong y Unifort fue consistente en ambos ensayos independientemente del aislado del nematodo y del modo en que se acumulaba la temperatura. Por el contrario, la resistencia de los patrones Multifort y Maxifort fue inconsistente y variaba dependiendo del ensayo, aislado del nematodo o del tomate susceptible que se utilizaba para contrastar el nivel de resistencia. En este estudio, los patrones Brigeor, Morgan, King Kong, Unifort y Emperador mostraron mayor eficiencia reduciendo la multiplicación de *M. arenaria* que de *M. javanica*. No obstante, la multiplicación de *M. javanica* en los patrones fue muy inferior a la alcanzada en los tomates susceptibles. La menor resistencia mostrada por los patrones Multifort y Maxifort se atribuye a las características genéticas propias de dichos patrones puesto que los restantes patrones mostraron alta resistencia bajo las mismas condiciones experimentales.

Los patrones pueden ser útiles para reducir el daño causado por el nematodo (formación de nódulos), reducir la tasa de crecimiento de la población y aumentar la producción aunque permitan cierto nivel de multiplicación del nematodo (DE MIGUEL, 2002; LÓPEZ-PÉREZ, *et al.*, 2006; CORTADA *et al.*, 2008; RIVARD *et al.*, 2010). No obstante, el hecho de que el nematodo se multiplique en los patrones puede limitar la utilidad de los mismos a medio y largo plazo debido a las altas poblaciones residuales del nematodo que quedan en el suelo para el siguiente cultivo (TALAVERA *et al.*, 2009). Por otra parte, el cultivo repetido de patrones en el mismo campo puede dar lugar a la selección de poblaciones virulentas que sobrepasan la resistencia conferida por el gen *Mi* en tomate. Es importante determinar la secuencia óptima de rotación para evitar la selección de estas poblaciones (TALAVERA *et al.*, 2009). Recientemente

han detectado poblaciones virulentas que rompen la resistencia en invernaderos donde se cultivaba patrones de tomate (VERDEJO-LUCAS *et al.*, 2012).

En resumen, la resistencia de los patrones de tomate incluidos en este estudio no se vio afectada por picos intermitentes en la temperatura del suelo superiores a los 28°C, lo cual sugiere que, el gen *Mi* tiene utilidad en una horquilla de temperaturas

del suelo más amplia de la que previamente se pensaba. En el escenario del cambio climático, estos resultados pueden ser de interés para los agricultores que hacen producción ecológica y/o producción fuera de temporada y para las compañías de semillas que desarrollan tomates resistentes a *Meloidogyne*.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias proyecto RTA2010-00017-C02 y Fondos FEDER de la Unión Europea. Los autores agradecen a las Empresas de Semillas las semillas proporcionadas para la realización del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- ARAUJO, M.T., BASSETT M.J., AUGUSTINE J.J., DICKSON, D.W. 1982a. *Effects of the temperature and duration of the initial incubation period on resistance to Meloidogyne incognita in tomato*. J. Nematol. 14: 411-413.
- ARAUJO, M.T., BASSETT M.J., AUGUSTINE J.J., DICKSON, D.W. 1982b. *Effect of diurnal changes in soil temperatures on resistance to Meloidogyne incognita in tomato*. J. Nematol. 14: 414-416.
- CORTADA, L., SORRIBAS, F.J., ORNAT, C., KALOSHIAN, I., VERDEJO-LUCAS, S. 2008. *Variability in infection and reproduction of Meloidogyne javanica on tomato rootstocks with the Mi resistance gene*. Plant Pathol. 57:1125-1135.
- DE MIGUEL A. 2002. *Grafting as a non-chemical alternative to methyl bromide for tomato in Spain*. In: BACHELOR, T. AND BOLIVAR, J. Proceedings of International Conference on Alternatives to methyl bromide: "The remaining challenges". Sevilla, Spain. Pp. 283-284.
- DEVIRAN, Z., SÖGÜT, M.A., MUTLU, N. 2010. *Response of tomato rootstocks with the Mi resistance gene to Meloidogyne incognita race 2 at differential soil temperatures*. Phytopathol. Mediterr. 49: 11-17.
- DROPKIN, V. H. 1969. *The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to Meloidogyne: reversal by temperature*. Phytopathology 59: 1632-1637.
- HOLTZMANN, O. V. 1965. *Effect of soil temperature on resistance of tomato to root-knot nematode (Meloidogyne incognita)*. Phytopathology 55: 990-992.
- LÓPEZ-PÉREZ, J., LE STRANGE, M., KALOSHIAN, I., PLOEG, A. 2006. *Differential response of Mi gene-resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (Meloidogyne incognita)*. Crop Prot. 25: 382-388.
- LOUWS, F. J., RIVARD, C.L., KUBOTA, C. 2010. *Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds*. Scientia Horticult. 127: 127-146.
- RIVARD, C.L., O'CONNELL, S., PEET, M.M., LOUWS, F.J. 2010. *Grafting tomato with interspecific rootstocks to manage diseases caused by Sclerotium rolfsii and southern root-knot nematode*. Plant Dis. 94: 1015-1021.
- ROBERTS, P.A., THOMASON, I.J. 1986. *Variability in reproduction of isolates of M. incognita and M. javanica on resistant tomato genotypes*. Plant Dis. 70: 547-551.
- SORRIBAS, F.J., ORNAT C., VERDEJO-LUCAS, S., GALEANO, M., VALERO, J. 2005. *Effectiveness and profitability of the Mi-resistant tomatoes to control root-knot nematodes*. Eur. J. Plant Pathol. 111: 29-38.
- TALAVERA, M., VERDEJO-LUCAS, S., ORNAT, C., TORRES, J., VELA, M.D., MACIAS, F.J., CORTADA, L., ARIAS, D.J., VALERO, J., SORRIBAS, F.J. 2009. *Crop rotations with Mi gene resistant and susceptible tomato cultivars for management of root-knot nematodes in plastic houses*. Crop Prot. 28: 662-667.
- TALAVERA, M., SAYADI, S., CHIROSA-RIOS, M., SALMERÓN, T., FLOR-PEREGRIN, E., VERDEJO-LUCAS, S. 2012. *Perception of the impact of root-knot nematode induced diseases in horticultural protected crops of south-eastern Spain*. Nematology 14: 517-527.
- TRIANTAPHYLLOU, A.C. 1975. *Genetic structure of races of Heterodera glycines and inheritance of ability to reproduce on resistant soybeans*. J. Nematol. 7: 356-64.
- VERDEJO-LUCAS, S., CORTADA, L., SORRIBAS, F.J., ORNAT, C. 2009. *Selection of virulent populations of Meloidogyne javanica by repeated cultivation of Mi resistance gene tomato rootstocks under field conditions*. Plant Pathol. 58: 990-998.
- VERDEJO-LUCAS, S., TALAVERA, M., ANORÉS, M.F. 2012. *Virulence response to the Mi.1 gene of Meloidogyne populations from tomato in greenhouses*. Crop Prot. 39: 97-105.